

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Filip Pendić

**CITOTOKSIČNOST DERIVATA
BENZIMIDAZOLA NA STANICE KOJE
RASTU U 2D I 3D KULTURI**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Filip Pendić

**CITOTOKSIČNOST DERIVATA
BENZIMIDAZOLA NA STANICE KOJE
RASTU U 2D I 3D KULTURI**

Završni rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva Zavoda za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Teuta Opačak-Bernardi

Rad ima 22 lista i 6 slika.

Zahvala

Posebnu zahvalnost dugujem mentorici, doc. dr. sc. Teuti Opačak-Bernardi, na strpljivosti i suradnji pri izradi završnoga rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na svoj potpori i savjetima koje su mi davali kroz cijelo školovanje.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Nastanak tumora	1
1.2. Kultura stanica	2
1.3. HeLa stanična linija	2
1.4. Rast stanica <i>in vitro</i>	3
1.5. Benzimidazoli	4
2. HIPOTEZA.....	6
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	7
4. MATERIJALI I METODE	8
4.1. Materijali	8
4.1.1. Ispitivani spojevi	8
4.1.2. Stanična linija	8
4.1.3. Kemikalije	8
4.2. Metode	9
4.2.1. Kultivacija stanica <i>in vitro</i>	9
4.2.2. Određivanje broja vijabilnih stanica u kulturi	9
4.2.3. MTT test	10
4.2.4. Statistička analiza podataka.....	11
5. REZULTATI	12
5.1. Određivanje citotoksičnog učinka derivata benzimidazola u 2D kulturi	12
5.2. Određivanje citotoksičnog učinka derivata benzimidazola u 3D kulturi	13
5.3. Usporedba citotoksičnog učinka derivata benzimidazola u 2D i 3D kulturi.....	13
6. RASPRAVA.....	15
7. ZAKLJUČAK.....	17
8. SAŽETAK.....	18
9. SUMMARY.....	19
10. LITERATURA	20
11. ŽIVOTOPIS.....	22

POPIS KRATICA

DNK (*eng. deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

HZ (*eng. hypoxic zone*) hipoksična zona

PZ (*eng. proliferation zone*) proliferativna zona

NZ (*eng. necrotic zone*) nekrotična zona

DMEM (*eng. Dulbecco's Modified Eagle's medium*) Dulbecco modificirani Eagleov medij

PBS (*eng. Phosphate-buffered saline*) fosfatom puferirana otopina soli

EDTA (*eng. ethylenediaminetetraacetic acid*) Etilendiamintetraoctena kiselina

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid

DMSO dimetil-sulfoksid

1. UVOD

Tumori danas predstavljaju jedan od najraširenijih medicinskih problema te su jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu (1). Incidencija tumora je u stalnom porastu, kako u svijetu tako i u Republici Hrvatskoj, te njihovu važnost kao veliki javnozdravstveni problem potvrđuju i podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo koji navode zloćudne bolesti kao drugi najvažniji uzrok smrti iza srčanih i krvožilnih bolesti. U 2015. godini ukupno je bilo 22503 slučaja novodijagnosticiranih zloćudnih bolesti s nešto većom incidencijom kod muškaraca nego žena. U istoj je godini od raka preminulo 14012 osoba (2). Svakodnevno se poduzimaju veliki naponi kako bi se poboljšali uvjeti života i liječenja oboljelih. Razvoj novih lijekova i načina terapija važan je dio tih nastojanja, ali činjenica da sama etiologija pojedinih tumora nije poznata ili do kraja razjašnjena, čini istraživanje teškim i kompliciranim.

1.1. Nastanak tumora

Život svake stanice odvija se u složenom ciklusu koji možemo podijeliti na interfazu i mitozu. Stanica veći dio vremena provodi u interfazi, koju karakterizira aktivan metabolizam te sinteza staničnih proteina. Također, u ovoj fazi dolazi do replikacije staničnog genoma. U fazi mitoze stanica prolazi niz procesa nakon kojih se podijeli na dvije stanice kćeri (3).

Svaki od ovih koraka reguliran je unutarstaničnim procesima znanim kao kontrolne točke. Glavna kontrolna točka nalazi se na kraju G_1 (eng. *Gap 1*) faze interfaze, te na temelju uvjeta odlučuje hoće li stanica ući u fazu replikacije deoksiribonukleinske kiseline (DNK). U kontrolnoj točki u G_2 (eng. *Gap 2*) fazi interfaze provjerava se ispravnost replicirane DNK. U kontrolnoj točki u fazi mitoze provjerava se jesu li svi kromosomi vezani za diobeno vreteno, te ukoliko su uvjeti ispunjeni, dioba se nastavlja. Ove kontrolne točke važne su za pravilan stanični ciklus jer otkrivaju moguće pogreške u novosintetiziranoj DNK te pokreću zaštitne mehanizme kojima ih je moguće otkloniti (3).

Do nastanka tumora dolazi kada stanica izgubi kontrolu nad svojim staničnim ciklusom. Nemogućnost kontrole staničnog metabolizma i replikacije genoma dovodi do nekontrolirane proliferacije tumorske stanice. Tako nastala tumorska masa potiskuje okolna tkiva te ometa normalan način funkcioniranja zahvaćenih organa. Nadalje, tumorsko tkivo zatim može metastazirati u druge dijelove tijela uzrokujući još teže posljedice za cijeli organizam. Iako je nastanak tumora usko povezan sa genetikom, treba naglasiti kako različiti vanjski čimbenici, kao i stil života, igraju važnu ulogu u nastanku tumora (4). Kancerogeni

spojevi koje pronalazimo u svakodnevnom okolišu, poput ispušnih plinova u industriji i prijevozu, dima cigarete te predmetima s kojima smo u kontaktu, na molekularnoj razini uzrokuju oštećenja DNK čime čine važan faktor u poremećaju staničnog ciklusa (5). Nezdrava prehrana, povećana tjelesna masa i nedostatak tjelesne aktivnosti također se spominju kao indirektni faktori koji mogu pridonijeti razvoju tumora (4).

1.2. Kultura stanica

Nedostatak adekvatne terapije za veliki broj tumora, koji se sa sve većom učestalošću pojavljuju u populaciji, uzrok je stalne potrage za novim agensima i kandidatima za razvoj protutumorskih lijekova. S obzirom na specifičnosti tumorskih stanica i toksičnost spojeva koji se koriste u istraživanjima kao mogući budući lijekovi, očita je ograničenost primjene takvih spojeva u kliničkim testiranjima na pacijentima. Iz tog razloga, jedan od najvažnijih načina istraživanja tumora i razvoja novih lijekova jesu *in vitro* stanične kulture (6).

Početkom prošlog stoljeća, Ross Harisson uspijeva izolirati tkivo medularnog kanala žabljeg embrija u kapljici limfe na zatvorenom stakalcu dokazavši time kako je moguće održavati stanice živima izvan matičnog organizma. Sljedeći veliki napredak na polju istraživanja kultura stanica dolazi 1913. godine kada Alexis Carrel pokazuje kako je moguće kulturu održati živom duži vremenski period, uz stalnu dostupnost hranjivih sastojaka, ako je uzgajana u sterilnim uvjetima. Od tada je tehnologija uzgoja staničnih kultura znatno napredovala pa se danas u istraživačke svrhe koriste mnoge stanične linije, no najčešće je korištena HeLa stanična linija (7).

1.3. HeLa stanična linija

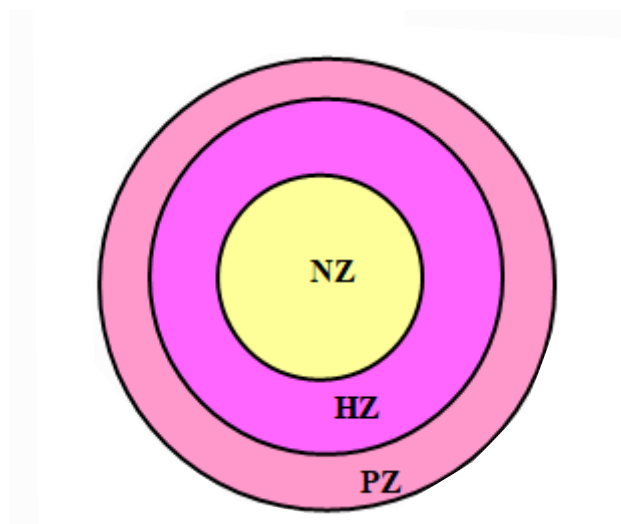
HeLa stanična linija je besmrtna linija nastala od humanih stanica adenokarcinoma grlića maternice. Izolirao ju je 1951. George Gey iz pacijentice Henriette Lacks, prema kojoj je stanična linija i dobila ime, kao prvu izoliranu staničnu kulturu (8). Za razliku od zdravih stanica s kojima se prije pokušavalo uspostaviti staničnu kulturu, HeLa stanična linija je tumorskog podrijetla te nema ograničen broj mitoza kroz koje može proći prije nego prirodnim putem dođe do apoptoze. Razlike između normalnih stanica i HeLa stanica najuočljivije su na razini genoma. Poput mnogih tumorskih stanica, genom HeLa stanica ispunjen je greškama te većim brojem kopija mnogih kromosoma, nego je to slučaj kod normalnih stanica. Dok zdrave humane tjelesne stanice sadrže 46 kromosoma, u HeLa

stanicama možemo pronaći između 76 i 80 kromosoma od kojih su mnogi (22-25) teško mutirani (9). Dosadašnja istraživanja pokazuju kako bi razlog takvog kariotipa mogla biti insercija dijela DNK humanog papiloma virusa 18 što za posljedicu ima nastanak proteina koji se veže za tumor supresorski protein p53 i čini stanicu podložnijom mutacijama (10). Kao tumorske stanice, HeLa stanice obilježava brza proliferacija što ih čini lakšima za održavanje i izrazito pogodnim za korištenje u raznim istraživanjima (9).

1.4. Rast stanica *in vitro*

Napretkom tehnologije razvijene su različite metode pripreme staničnih kultura, no osnova im je svima poprilično slična. Priprema započinje izdvajanjem uzorka ciljanog tkiva te njegovim usitnjavanjem koje može biti mehaničko ili enzimsko. Tako se razdvojene stanice zatim nanose u pripremljen medij za uzgoj gdje adheriraju za podlogu i nastavljaju sa svojim staničnim ciklusom dijeleći se dok ne prekriju cijelu podlogu. Kada stanice postignu konfluentnost, primarna kultura se odvaja od podloge dodavanjem enzima tripsina te se stanice sakupljaju u novi medij za uzgoj. Suspenzija stanica nakon toga može se ponovno nasaditi na novu podlogu (7).

Stanice rastu u jednom sloju i neograničeno se razmnožavaju. Takav rast stanica koje su prihvaćene za podlogu je vrlo različit od staničnog rasta u samom tumoru te dvodimenzionalna (2D) kultura ne može u potpunosti pokazati utjecaj novih spojeva na sam tumor (6). Razlog tomu je nedostatak prirodnih uvjeta u kojima se stanica nalazi u tkivu *in vivo* što može utjecati na pogrešno tumačenje rezultata. Za razliku od 2D kulture, u 3D staničnoj kulturi, stanice oblikuju prostornu formaciju zvanu sferoid. U 3D kulturi stanični je mikrokoliš mnogo sličniji onome u tkivu jer se stanice nalaze u različitim fazama rasta. U sferoidima možemo razlikovati tri zone. Središnji dio sferoida čini nekrotična zona (*eng. necrotic zone*, NZ) u kojoj nalazimo veći broj nekrotičnih stanica zbog nedostatka hranjivih tvari i smanjene dostupnosti kisika, a na površini se nalazi zona proliferacije (*eng. proliferation zone*, PZ) koju čine žive stanice koje se aktivno umnožavaju. Između ta dva sloja nalazi se sloj neaktivnih hipoksičnih stanica (*eng. hypoxic zone*, HZ) (Slika 1). Na taj su način stanice različito izložene dostupnim hranjivim tvarima te ispitivanim spojevima što omogućava bolji uvid u odgovor stanica na tretiranje ciljanim agensima (11). Rast stanica u sferoidu pokazuje sposobnost supstance da prođe kroz slojeve stanica i utječe na jezgru tumora.

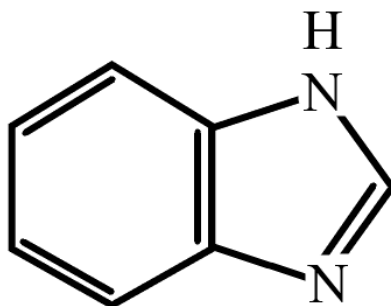


Slika 1. Shematski prikaz strukture sferoida

Stanične se linije kultivirane *in vitro* razlikuju od stanica koje rastu *in vivo* po mnogim svojstvima. Iako sferoidi koji nastaju u 3D staničnim kulturama bolje oponašaju tkivo od monosloja stanica u 2D kulturi, oni ne mogu biti potpuna zamjena stvarnom tkivu. Pri *in vitro* kultivaciji dolazi do uzgoja samo jednog staničnog tipa dok u *in vivo* sustavu to ne mora biti slučaj i na jednom mjestu može biti više staničnih tipova. Živčani i endokrini utjecaj na stanice u organizmu čini važan faktor koji utječe na metabolizam i proliferaciju dok je u *in vitro* sustavu nepostojan. Specifične interakcije između stanica u tkivu, kao i tip korištenog energetskeg metabolizma, su nešto drugačiji nego u *in vitro* sustavu (12).

1.5. Benzimidazoli

Benzimidazol (Slika 2) je heterociklički aromatski organski spoj koji nastaje spajanjem benzena i imidazola, a njegovi derivati imaju širok spektar bioloških aktivnosti. Mnogi se spojevi s molekulom benzimidazola kao bazom danas koriste kao protuparazitski lijekovi (13). Zbog heterocikličke strukture, benzimidazoli nalikuju biomolekulama koje normalno sudjeluju u staničnom ciklusu te pokazuju veliku sposobnost vezanja za dvolančanu molekulu DNK. Takvim interakcijama ometaju normalan stanični ciklus što dovodi do apoptoze stanica. Dodavanjem različitih bioaktivnih skupina na osnovu molekule benzimidazola, povećavaju se farmakološka svojstva takvih molekula. Upravo zbog toga su uzeti kao osnova za razvoj novih molekula koje bi trebale pokazati značajno protutumorsko djelovanje (14).



Slika 2. Struktura molekule benzimidazola

Iako mehanizam djelovanja benzimidazola nije u potpunosti poznat, istraživanja upućuju na mogućnost nastanka kompleksa između derivata benzimidazola i DNK, koji uzrokuju pogreške u sintezi i popravku DNK (15). Ometanje sinteze DNK će imati jači utjecaj na stanice koje brzo proliferiraju poput tumorskih. S obzirom da tumorske stanice, zbog visoke stope proliferacije, dijele osnovne sličnosti u metaboličkim potrebama s parazitskim organizmima, protuparazitski kemoterapeutici pokazuju se kao moguća protutumorska terapija (14).

2. HIPOTEZA

Benzimidazoli snažnije djeluju na stanice u 2D kulturi nego na stanice u 3D kulturi; 3D kultura je otpornija na antiproliferativno djelovanje derivata benzimidazola.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja jesu:

1. odrediti antiproliferativni potencijal testiranih spojeva u uvjetima kulture *in vitro*,
2. utvrditi postoji li razlika u učinkovitosti spojeva na stanice u monosloju u usporedbi s 3D kulturom (sferoidima),
3. ustanoviti povezanost između koncentracije spojeva i inhibicije staničnog rasta.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitivani spojevi

Korišteni derivati benzimidazola sintetizirani su na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. U *in vitro* pokusu korištena su tri spoja označena kao MB-123, MB-127 te MB-129. Svaki je od spojeva pripremljen razrjeđivanjem stock otopine novosintetiziranih spojeva koncentracije 1×10^{-2} mol/L u mediju. Konačne koncentracije spojeva korištene u pokusu iznosile su 10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L.

4.1.2. Stanična linija

Učinak derivata benzimidazola proučavan je na humanoj tumorskoj staničnoj liniji u dvodimenzionalnoj i trodimenzionalnoj staničnoj kulturi. U oba je slučaja korištena HeLa stanična linija – adenokarcinom grlića maternice.

4.1.3. Kemikalije

Tijekom istraživanja korištene su kemikalije i reagensi različitih proizvođača:

- Medij za održavanje Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM) uz dodatak glukoze (4,5 g/L) s L-glutaminom, 10 % temperaturno inaktivirani goveđi serum i antibiotik (1 %), Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Medij za pokus Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM) uz dodatak glukoze (4,5 g/L) s L-glutaminom i 10 % temperaturno inaktivirani goveđi serum, Capricorn Scientific GmbH, Njemačka
- Fosfatom puferirana otopina soli (PBS)
- 0,25 % tripsin EDTA, Pan Biotech, Njemačka
- Tripansko plavilo 0,4 %, Lonza, SAD
- MTT reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), PanReac AppliChem, Njemačka
- Dimetilsulfoksid (DMSO), Acros Organics, SAD

4.2. Metode

4.2.1. Kultivacija stanica *in vitro*

Uzgoj staničnih kultura odvija se u posebno opremljenim laboratorijima koji zahtijevaju osigurane uvjete za uzgoj stanica. Takvi laboratoriji opremljeni su kabinetima za sterilni rad s laminarnim protokom zraka u kojima se izvode svi postupci kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka, a što može utjecati na same rezultate pokusa. Sav pribor i posuđe, kao i korišteni reagensi, moraju biti sterilni kako bi se izbjegla kontaminacija.

Stanice su nasadene u boce za uzgoj Nunc™ EasYFlask™ površine 25 cm² (Thermo Scientific, Danska) i inkubirane u CO₂ inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, SAD) na 37 °C i 5 % CO₂ u vlažnoj atmosferi.

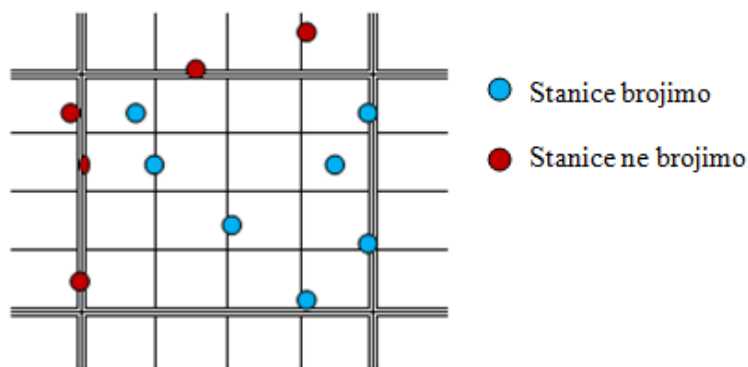
HeLa stanice uzgajane su u DMEM mediju s dodatkom glukoze (4,5 g/L), L-glutamina, goveđeg seruma (10 %) i antibiotika (1 %). DMEM medij korišten u pokusu sadrži također sve navedene sastojke osim antibiotika.

4.2.2. Određivanje broja vijabilnih stanica u kulturi

Prije izvođenja testa potrebno je utvrditi broj vijabilnih stanica u uzorku. Vijabilnost stanica određivana je bojenjem s tripan plavilom i promatranjem pod invertnim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka) u Bürker-Türkovoju komorici (Slika 3). Test se izvodi tako da se uzme 50 µl stanične suspenzije i prenese u jažicu. Zatim se dodaje 100 µl tripan plavila. Žive stanice zbog svoje očuvane stanične membrane ne dopuštaju ulazak boje u stanicu i ostaju nebojene. Za razliku od njih, mrtve stanice zbog oštećene membrane poprimaju plavo obojenje. Žive stanice prebrojavaju se unutar četiri kvadratića te se ukupan broj vijabilnih stanica zatim određuje prema formuli:

$$R = \frac{3}{4} \times N \times 10^4 \text{ stanica/ml}$$

gdje je R ukupan broj vijabilnih stanica, a N broj živih stanica određen u Bürker-Türkovoju komorici. Broj 4 označava broj polja u komorici, a broj 3 faktor razrjeđenja.



Slika 3. Princip brojanja stanica u Bürker-Türkovoj komorici

4.2.3. MTT test

Učinak ispitivanih kemijskih spojeva na rast stanica određen je MTT testom. MTT test izvodi se dodavanjem žute otopine MTT soli (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u jažice sa stanicama. U metabolički aktivnim stanicama enzim dehidrogenaza reducira MTT sol u formazan koji se u stanicama nakuplja u obliku ljubičastih kristala. Dodatkom otapala kristali se otapaju dajući obojenu otopinu. Intenzitet obojenja otopine se zatim očitava spektrofotometrijski na valnoj duljini od 595 nm pomoću mikročitača (iMark, BIO RAD, SAD). Intenzitet obojenja proporcionalan je broju metabolički aktivnih stanica u uzorku.

HeLa stanice su u dvodimenzionalnoj staničnoj kulturi nasađene na mikrotitarske ploče namijenjene uzgoju adherentnih stanica u volumenu od 180 μ l koncentracije 2×10^4 stanica/ml. Jednaki volumen stanica nasađujemo kao kontrolne stanice te se ostavljaju netretirane u istim uvjetima. Ostavljaju se dvije kontrole sa staničnom suspenzijom volumena 180 μ l te se pohranjuju na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do 5 dana. Nasađene stanice ostavljaju se nakon toga u inkubatoru na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5 % CO_2 kroz 24 sata kako bi se prihvatile za podlogu. Stanice su nakon inkubacije tretirane dodavanjem 20 μ l otopine testiranih derivata benzimidazola u konačnim koncentracijama od 10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L. Stanice se zatim ponovno stavljaju u inkubator na 72 sata. MTT test započinjemo uklanjanjem medija iz jažica i dodatkom 40 μ l MTT reagensa razrijeđenog 1:10 u PBS-u. Jednaka količina razrijeđenog MTT reagensa dodaje se i u sve kontrole. Tako tretirane stanice ponovno stavljamo u inkubator na 4 sata. Nakon inkubacije u sve jažice dodaje se 160 μ l DMSO-a, te nakon miješanja mikrotitarskih ploča na tresilici (JOUAN BR4i) pri 200 okretaja kroz 15 minuta, ploče se očitaju na mikročitaču.

Stanice za trodimenzionalnu kulturu nasađene su na mikrotitarsku ploču s konusnim dnom u volumenu od 180 μ l i koncentraciji 1×10^4 stanica/ml. Mikrotitarske ploče su zatim centrifugirane na 1100 okretaja kroz 10 minuta. Nakon centrifugiranja, ploče se inkubiraju 3 dana na 37 °C i 5 % CO₂ kako bi se formirali sferoidi. Nakon 72 sata medij je zamijenjen te je dodano 20 μ l otopine derivata benzimidazola u konačnim koncentracijama od 10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L. Nakon nove inkubacije u trajanju od 3 dana uklonjen je sav medij i dodano 40 μ l razrijeđenog MTT-a. Jednak volumen MTT reagensa dodan je i u sve kontrole. Stanice se zatim inkubiraju 4 sata. Po završetku inkubacije u jažice dodajemo po 160 μ l DMSO-a te nakon lagane trešnje od 30 minuta koja potiče otapanje nastalih formazanskih kristala, intenzitet obojenja se očitava na mikročitaču.

4.2.4. Statistička analiza podataka

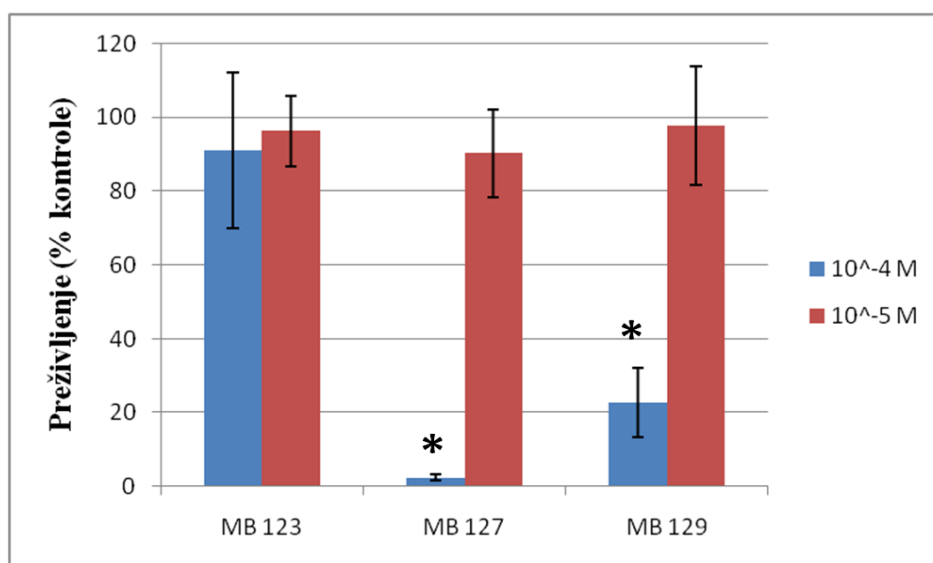
Rezultati dobiveni MTT testom analizirani su primjenom statističkog programa Statistica for Windows (v. 13.0). Rezultati su prikazani u obliku grafičkog prikaza srednjih vrijednosti rezultata sa standardnim devijacijama (\pm SD) dobivenim u tri nezavisna mjerenja ponavljana u triplikatu. Za analizu statističke značajnosti korištena je jednosmjerna ANOVA s post hoc Bonferroni korekcijom. Razina statističke značajnosti za sve obrađene i prikazane rezultate iznosi $p < 0,05$.

5. REZULTATI

Citotoksični učinak tri derivata benzimidazola praćen je na HeLa staničnoj liniji u dvodimenzionalnoj (2D) i trodimenzionalnoj (3D) staničnoj kulturi. Obje kulture tretirane su spojevima MB-123, MB-127 i MB-129 u koncentracijama od 10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L u roku od 72 sata. Prikazani rezultati su srednje vrijednosti dobivenih rezultata i prikazuju postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na kontrolu.

5.1. Određivanje citotoksičnog učinka derivata benzimidazola u 2D kulturi

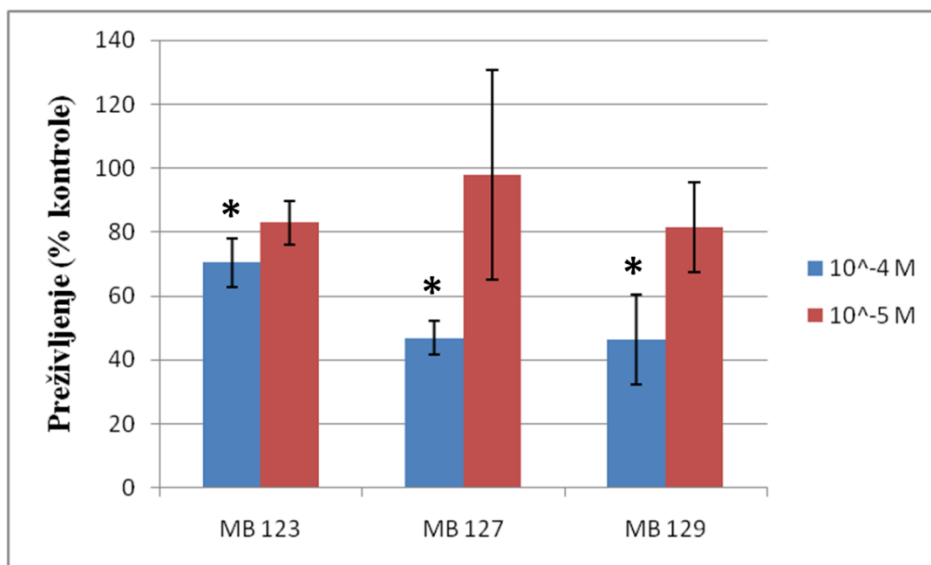
U 2D kulturi spoj MB-127 pokazuje citotoksičan učinak u obje primijenjene koncentracije (10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L) s mnogo značajnijim učinkom u višoj koncentraciji (10^{-4} mol/L). Kod spoja MB-129 zapažen je značajan utjecaj pri koncentraciji od 10^{-4} mol/L, dok je isti izostao pri nižoj primijenjenoj koncentraciji od 10^{-5} mol/L. Spoj MB-123 nije pokazao značajan učinak na tretirane stanice ni u jednoj primijenjenoj koncentraciji (Slika 4).



Slika 4. Stanice u 2D kulturi tretirane su derivatima benzimidazola (MB-123, MB-127 i MB-129) u periodu od 72 sata pri koncentracijama od 10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L. Citotoksični učinak određen je MTT testom kroz tri ponavljanja. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*).

5.2. Određivanje citotoksičnog učinka derivata benzimidazola u 3D kulturi

Kod 3D kulture primijećen je inhibitorni učinak svih testiranih spojeva u primijenjenoj koncentraciji od 10^{-4} mol/L s nešto blažim djelovanjem spoja MB-123 (Slika 5). S druge strane, niti jedan testirani spoj nije pokazao značajan antiproliferativan učinak na rast stanica u nižoj primijenjenoj koncentraciji (10^{-5} mol/L).

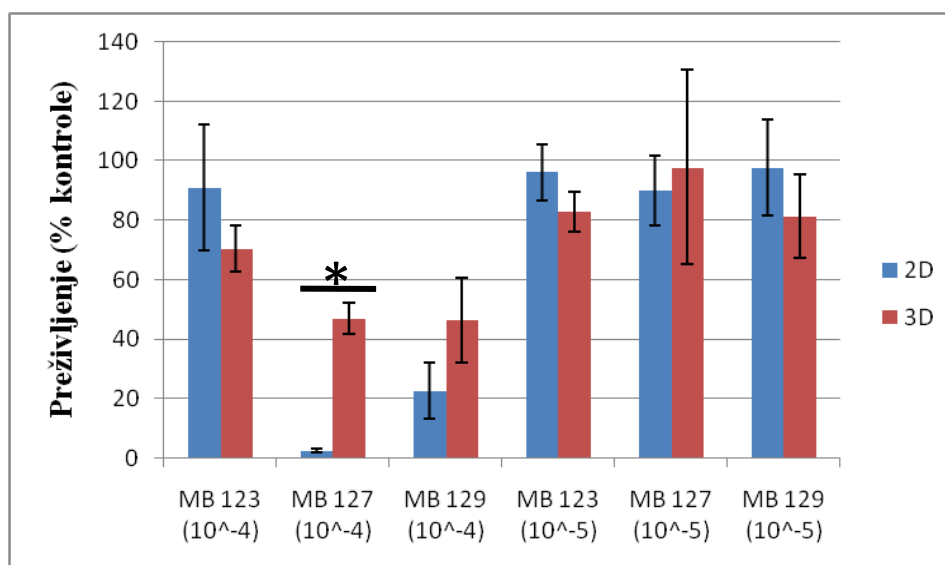


Slika 5. Stanice u 3D kulturi tretirane su derivatima benzimidazola (MB-123, MB-127 i MB-129) u periodu od 72 sata pri koncentracijama od 10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L. Citotoksični učinak određen je MTT testom kroz tri ponavljanja. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*).

5.3. Usporedba citotoksičnog učinka derivata benzimidazola u 2D i 3D kulturi

Usporedba rezultata dobivenih uzgojem HeLa stanica u 2D i 3D kulturi *in vitro*, koje su tretirane derivatima benzimidazola, prikazana je na slici 6. Ispitano je djelovanje spojeva MB-123, MB-127 i MB-129 u koncentracijama od 10^{-4} mol/L te 10^{-5} mol/L.

U 2D kulturi, pri koncentraciji od 10^{-5} mol/L, pokazuje se slabiji inhibicijski učinak derivata na rast stanica, nego u 3D kulturi s iznimkom spoja MB-127. Spoj MB-127 pokazao je najveći citotoksični učinak na stanice u obje kulture, posebno pri koncentraciji 10^{-4} mol/L, u 2D kulturi. Uz njega također možemo istaknuti i spoj MB-129 koji je u koncentraciji od 10^{-4} mol/L pokazao određeni inhibitorni učinak na obje kulture.



Slika 6. Usporedba preživljenja stanica nakon tretiranja derivatima benzimidazola u koncentracijama od 10^{-4} mol/L i 10^{-5} mol/L u 2D i 3D kulturi. Statistički značajna p vrijednost definirana je kao $p < 0,05$ (*).

Statistički značajna razlika u učinku na 2D i 3D kulturu pokazana je samo kod derivata MB-127 pri najvećoj koncentraciji.

6. RASPRAVA

Kao jedan od najvažnijih medicinskih problema u svijetu, karcinomi danas predstavljaju vrlo dinamično područje istraživanja u biomedicini (1). S obzirom da su godišnje odgovorni za velik broj smrti, a uz stalni porast incidencije, stalno se nastoje razviti novi načini liječenja. Jedan od novijih pristupa uključuje korištenje benzimidazolske jezgre u razvoju novih spojeva sa širokim farmakološkim svojstvima (14). Derivati benzimidazola pokazuju svojstvo vezanja za dvostruku uzvojnici DNK čime uzrokuju pogreške pri sintezi i popravku DNK potičući stanice na apoptozu (15). U ovom radu istraživani su citotoksični potencijal derivata benzimidazola MB-123, MB-127 i MB-129 na staničnoj liniji nasađenoj u 2D i 3D kulturi.

Prijašnja istraživanja utvrdila su kako se stanice funkcionalno ponašaju drugačije u dvodimenzionalnoj kulturi gdje rastu u jednom sloju, nego u *in vivo* sustavu. Iz tog je razloga utvrđeno kako puno bolji sustav za ispitivanja čini trodimenzionalna kultura u kojoj stanice oblikuju prostornu formaciju zvanu sferoid (6). Kao i u stvarnom tumorskom tkivu, stanice u sferoidima imaju različit pristup kisiku, hranjivim tvarima pa i ispitivanim spojevima s obzirom nalaze li se na površini sferoida ili u njegovoj unutrašnjosti (11). Osim toga, u 3D kulturi nalazimo više stanica koje se nalaze u različitim fazama staničnog ciklusa što također može utjecati na osjetljivost stanica na inhibitorni učinak testiranih spojeva (6).

Uspoređujući citotoksični učinak različitih koncentracija derivata benzimidazola na ispitivane stanične kulture, ustanovljeno je da spoj MB-127 pokazuje najveći citotoksični potencijal na rast stanica. Također, treba spomenuti i spoj MB-129 koji pokazuje sličan učinak. Vidljiva razlika u djelovanju na 2D i 3D kulturu je na granici statističke značajnosti zbog veće varijabilnosti u rezultatima. Važno je naglasiti značajan učinak ova dva spoja na 3D staničnu kulturu što im daje velik potencijal za daljnji razvoj i istraživanja. S druge strane, spoj MB-123 nije pokazao znatan inhibitorni učinak na tumorske stanice pri ispitivanim koncentracijama kao što je slučaj kod spojeva MB-127 te MB-129.

Kako navode AlAjmi i suradnici, derivati benzimidazola s atomima metala poput cinka i bakra u svojoj strukturi pokazuju svojstvo da ciljano djeluju na stanice s većim proliferativnim potencijalom (15). S obzirom da je to jedno od glavnih obilježja tumorskih stanica, ovo pokazuje kako spojevi koji sadrže benzimidazolski heterociklički prsten u kombinaciji s različitim funkcionalnim skupinama čine važan faktor u daljnjem razvoju usmjerene protutumorske terapije.

Wang i suradnici ispitivali su protutumorski potencijal novosintetiziranih derivata benzimidazola na tri različite tumorske stanične linije. Dokazali su njihov toksičan učinak na stanice raka tako što svojom aktivnošću induciraju apoptozu i autofagiju. Nadalje, zaključili su kako dodajući kisikov atom u strukturu derivata postižu još bolji učinak na ispitivane linije te manju toksičnost na normalne tjelesne stanice (16). Navode i citotoksičan učinak derivata benzimidazola na HeLa staničnu liniju što, uzimajući u obzir rezultate ovog istraživanja, naglašava njihov potencijal u razvoju novih spojeva sa protutumorskom aktivnošću.

U daljnjim istraživanjima potrebno je ispitati učinak više derivata benzimidazola različitih obilježja na drugim tumorskim staničnim linijama.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. novosintetizirani derivati benzimidazola pokazuju različite antiproliferativne učinke na stanice koje rast u 2D i 3D kulturi,
2. najučinkovitiji su derivati MB-127 te MB-129 i to u višoj koncentraciji (10^{-4} mol/L),
3. stanice koje rastu u 3D kulturi otpornije su na djelovanje ispitivanih derivata od stanica koje rastu u 2D kulturi.

8. SAŽETAK

Uvod: Benzimidazol je heterociklički aromatski organski spoj koji nastaje spajanjem benzena i imidazola. Zbog svoje strukture nalikuje biomolekulama koje normalno sudjeluju u staničnim procesima te pokazuje sposobnost vezanja za dvolančanu DNK. Dodavanjem različitih bioaktivnih skupina na osnovu molekule, povećavaju se farmakološka svojstva takvih molekula. Zbog toga su uzeti kao osnova za razvoj novih molekula sa protutumorskim djelovanjem.

Cilj: Cilj istraživanja jest ispitati utjecaj derivata benzimidazola na rast stanica u uvjetima *in vitro* te utvrditi postoji li razlika u djelovanju spojeva na stanice koje rastu u jednom sloju i sferoidima.

Materijali i metode: Za potrebe istraživanja pripremljena je dvodimenzionalna i trodimenzionalna HeLa stanična kultura. Stanične linije inkubirane su na 37 °C uz 5 % CO₂. Nakon tretiranja stanica derivatima benzimidazola (MB-123, MB-127, MB-129) i inkubacije od 72 sata, učinak ispitivanih spojeva na rast stanica određen je MTT testom.

Rezultati: Testirani derivati benzimidazola pokazuju citotoksičan učinak ovisno o primijenjenoj koncentraciji i staničnoj kulturi. Najbolji inhibicijski učinak na rast stanica imao je MB-127 u koncentraciji od 10⁻⁴ mol/L.

Zaključak: Razlikuje se odgovor stanica uzgojenih u 2D i 3D kulturi na utjecaj derivata benzimidazola, ovisno o tipu spoja i primijenjenoj koncentraciji.

Ključne riječi: benzimidazol; citotoksičnost; derivati benzimidazola; kultura stanica; tumorske stanice

9. SUMMARY

Title: Cytotoxicity of benzimidazole derivatives on 2D and 3D cell cultures

Introduction: Benzimidazole is a heterocyclic aromatic organic compound which is produced by fusion of benzene and imidazole. Because of its structure, it is similar to biomolecules which normally participate in cell processes and it exhibits an ability to attach to double-stranded DNA. Adding different bioactive functional groups to the molecule base increases the pharmacological properties of such molecules. For that reason, they are utilised as a base for development of new molecules with anti cancer activity.

Objective: The aim of the study is to examine the effect of benzimidazole derivatives on the growth of cells under *in vitro* conditions and to determine if there is a difference in the effect of compounds on cells which grow in monolayer and spheroids.

Materials and Methods: For the purposes of the research, two-dimensional and three-dimensional HeLa cell cultures were prepared. Cell lines were incubated at a temperature of 37 °C with 5 % CO₂. After treating the cells with the benzimidazole derivatives (MB-123, MB-127, MB-129) and incubating them for 72 hours, the effect of tested compounds on cell growth was determined by an MTT assay.

Results: Tested benzimidazole derivatives show cytotoxic activity dependent on the prepared concentration and cell culture. The best inhibitory effect on cell growth was detected for MB-127 at a concentration of 10⁻⁴ mol/L.

Conclusion: Cells grown in 2D and 3D culture respond differently to the effects of benzimidazole derivatives depending on the type of compound and prepared concentrations.

Keywords: benzimidazole; cell culture; cytotoxicity; derivatives of benzimidazole; tumour cells

10. LITERATURA

1. Kaidar-Person O, Bar-Sela G, Person, B. The Two Major Epidemics of the Twenty-First Century: Obesity and Cancer. *Obes Surg.* 2011;21:1792-1797
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske; Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018.
3. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: Molekularni pristup. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
4. Bishop KS, Ferguson LR. The Interaction between Epigenetics, Nutrition and the Development of Cancer. *Nutrients.* 2015;7:922-947
5. Nagel G, Stafoggia M, Pedersen M, Andersen ZJ ,Galassi C, Munkenast J, i sur. Air pollution and incidence of cancers of the stomach and the upper aerodigestive tract in the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Int J Cancer.* 2018
6. Edmondson R, Jenkins Broglie J, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207-218
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, i sur. *Molecular Biology of the Cell.* 4. izd. New York: Garland Science; 2002.
8. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:1463-1467
9. Landry J, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, i sur. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda).* 2013;3:1213-1224
10. Ambros PF, Karlic HI. Chromosomal insertion of human papillomavirus 18 sequences in HeLa cells detected by nonisotopic in situ hybridization and reflection contrast microscopy. *Hum Genet.* 1987;77:251-254
11. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, i sur. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep.* 2015;33:1837-1843
12. Glavaš-Obrovac Lj. *Kultura stanica. Interna skripta za studente doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo.* Osijek: Medicinski fakultet Osijek Sveučilište „J. J. Strossmayer“; 2008.
13. Katzung i sur. *Temeljna i klinička farmakologija.* 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

14. Krstulović L, Stolić I, Jukić M, Opačak-Bernardi T, Starčević K, Bajić M, i sur. New quinoline-arylamidine hybrids: Synthesis, DNA/RNA binding and antitumor activity. *Eur J Med Chem.* 2017;137:196-210
15. AlAjmi MF, Hussain A, Rehman T, Khan AA, Shaikh PA, Khan RA. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Benzimidazole-Derived Biocompatible Copper(II) and Zinc(II) Complexes as Anticancer Chemotherapeutics. *Int J Mol Sci.* 2018;19:1492
16. Wang XJ, Chu NY, Wang QH, Liu C, Jiang CG, Wang XY, i sur. Newly synthesized bis-benzimidazole derivatives exerting anti-tumor activity through induction of apoptosis and autophagy. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(19):6297-6300

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Filip Pendić

Datum i mjesto rođenja: 1. studenoga 1996., Osijek

Adresa: Vladimira Nazora 35, Valpovo

Telefon: 099 697 2297

E-mail: pendo1996@gmail.com

Obrazovanje:

2015. – ... Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek,
sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

2011. – 2015. Srednja škola Valpovo, opća gimnazija

2003. – 2011. Osnovna škola Matije Petra Katančića, Valpovo